文章编号: 1001-0580(2008)05-0513-03　中图分类号: R 734.2　文献标识码: A　【专题报道】

人乳头瘤病毒感染与非吸烟女性肺癌关系*

李雪莲[1], 关鹏[1], 尹智华[1], 白维君[2], 崔泽实[3], 周宝森[1]

摘　要: 目的　探讨人乳头瘤病毒(HPV)感染与非吸烟女性肺癌的相关性, 以及HPV感染对脆性组氨酸三联体(FHIT)基因杂合性丢失的影响。方法　采用1∶1匹配的病例对照研究方法, 应用PCR技术检测肺癌组织与对照组织中HPV-DNA相关序列, 同时检测FHIT基因杂合性丢失状况。结果　肺癌组织HPV-E6检出率高于对照组, *OR* = 3.500, 高危型HPV感染肺组织中FHIT基因杂合子丢失率较高。同时HPV感染与口服避孕药的使用、烹调油烟暴露及既往肺部疾病史间存在交互作用。结论　高危型HPV感染与女性肺癌的发生有关, HPV感染引发的肺癌可能与基因整合使FHIT基因杂合性丢失有关, 同时与口服避孕药的使用、烹调油烟暴露及既往肺部疾病史等存在协同效应。

关键词: 人乳头瘤病毒; FHIT基因; 女性肺癌

Relationship between HPV infection and lung cancer in nonsmoking female

LI Xue-lian, GUAN Peng, YIN Zhi-hua, et al. Department of Epidemiology, College of Public Health, China Medical University (Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective　To explore the relation between HPV infection and lung cancer in female nonsmoker, and to investigate its relationship with LOH of FHIT gene. **Methods**　Lung cancer specimens and control specimens were examined for the sequences of nucleotide markers for FHIT gene and fragment of HPV-DNA by PCR. **Results**　HPV E6 had a higher prevalence in cancer tissue than that in normal tissues, *OR* = 3.500. In all 19 cases of HPV infection, there were 15 cases in which the FHIT gene LOH was found, more than that of non-infection. HPV infection interacted with some lung cancer risk factors. **Conclusion**　HPV infection contribues to lung cancer in nonsmoking female. LOH of FHIT gene might be involved in carcinogenesis of HPV related lung cancer, and has cooperative effect with other risk factors.

Key words: HPV; fragile histidine triad (FHIT) gene; lung neoplasms in female

人乳头瘤病毒(HPV)是一种DNA病毒, 感染人和动物的皮肤或粘膜可引起增殖性损伤。人类感染HPV十分普遍, 在自然人群中感染率差异较大, 从低于1%到高达50%, 在性活跃人群中达20%~80%以上, 女性高于男性[1,2]。已有研究表明, HPV感染与泌尿生殖道、食管、头颈部、呼吸道等多个部位的肿瘤发生有关。

脆性组氨酸三联体(FHIT)基因是一个重要的抑癌基因[3]。在宫颈癌的相关研究中已经有研究证实, HPV整合位点DNA的插入可能导致FHIT基因的断裂或失活, 发现该基因的杂合性丢失与高危型HPV的感染有关[4]。本研应用聚合酶链反应(PCR)方法分析60例女性肺癌患者3号染色体长臂12~14区(3q12~14)3个位点微卫星多态标记物的杂合性丢失(LOH), 以期寻找肿瘤抑制基因FHIT的缺失区域。同时应用高灵敏度的PCR技术检测女性肺癌组织中的HPV DNA序列, 探讨HPV感染、FHIT基因LOH与非吸烟女性肺癌发生的相关性, 及HPV感染对FHIT基因缺失的影响。

1　对象与方法

1.1　对象　病例组织标本取自辽宁省级医院住院手术治疗非吸烟女性原发肺癌患者, 年龄35~75岁, 所有病例术前均未接受化学治疗及放射治疗, 术后经病理证实为肺癌, 实际收集有效病例60例, 其中腺癌37例, 鳞癌23例。对照为非吸烟女性, 按年龄(±5岁)与病例1∶1匹配, 标本为肺部良性病变(气胸22例, 支气管扩张15例, 肺结核球21例)病理标本58例及尸检正常肺组织标本2例。分类标记后, -70℃深冻保存。

1.2　方法

1.2.1　调查内容　采用统一的调查表进行调查。内容包括个人基本情况、生活方式、月经生育、既往疾病史等。

1.2.2　基因组DNA提取　TRIzol(invitrogen)试剂提取组织基因组DNA, 紫外分光光度计测量 A_{260}, A_{280} 定量。DNA样品经0.1 mol/L缓冲液调节pH值, 加乙二胺四乙酸至终浓度1 mmol/L, 20℃保存。

1.2.3　HPV DNA检测(表1)　引物: 选用可扩增HPV各型的通用型引物L1及分别扩增HPV16、18型的E6、E7特异性引物3对。PCR扩增: PCR反应试剂(大连TaKaRa宝生物工程公司)。扩增条件为94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min共30个循环, 72℃延伸5 min。每次实验均设阳性对照, 对照标本为已证实有HPV感染的尖锐湿疣标本, HPV 16、18型对照分别用已知阳性感染的宫颈癌细胞系Siha、Hela基因组DNA。配制1.5%的琼脂糖凝胶, 核酸染料染色, 上样, 100 V电压下电泳约30 min, 于紫外透视仪上观察结果并照相。

表1　HPV引物序列及长度

引　物	序列	长度(bp)
HPV　L1	5′CGTCC{C/A}A{G/A}{G/A}GGA{T/A}ACTGATC3′	450
	5′GC{C/A}CAGGG{T/A}CATAA{T/C}AATGG3′	
HPV　E6	5′GAACAGCAATACAACAAACCG3′	315
	5′CCATGCATGATTACAGCTGG3′	
HPV　E7	5′TGCCAGAAACCGTTGAATCC3′	152
	5′CAATGTCTTGCAATGTTGCC3′	
D3S1300	5′AGCTCACATTCTAGTCAGCCT3′	220
	5′GCCAATTCCCCAGATG3′	
D3S1234	5′CCTGTGAGACAAAGCAAGAC3′	317
	5′GACATTAGGCACAGGGCTAA3′	
D3S1313	5′CCCCTTGGAAAATCACTG3′	259
	5′CCATGAATAAGCCTTGCC3′	

* 基金项目: 国家自然科学基金(30471493); 美国中华医学基金(00-726)

作者单位: 1. 中国医科大学流行病学教研室, 沈阳 110001; 2. 辽宁省肿瘤医院; 3. 中国医科大学实验技术中心
作者简介: 李雪莲(1981-)女, 河北沧州人, 硕士在读, 主要从事肿瘤分子流行病学研究。
通讯作者: 周宝森

1.2.4 FHIT 基因杂合子丢失检测 FHIT 基因引物: 选择物理定位于 3 号染色体长臂 12~ 14 区域的 3 个位点的微卫星标志物: D3S1234, D3S1300, D3S1313。PCR 扩增: 扩增条件为 94℃预变性 2 min, 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 1 min 共 30 个循环, 72℃延伸 5 min。实验结果的观察: 4 μl PCR 扩增产物与等体积变性上样缓冲液(含 98% 去离子甲酰胺配制) 混合, 95℃变性 10 min, 冰浴后骤冷, 加样于含 8 mol/L 尿素的 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 60 V 电压下电泳约 4 h, 银染后观察。杂合性缺失的判定标准: 将肿瘤组织与正常组织 DNA PCR 产物同时上样比较, 若肿瘤的某一等位基因条带消失或相对密度减少 50% 以上, 则记为 LOH。

1.3 统计分析 将拟分析的因素分别予以量化和分级, 建立 SPSS 13.0 数据库。分类资料采用 χ^2 检验分析相对危险度, 进行多因素 Logistic 回归分析, 叉生法分析 HPV 感染及 FHIT 基因与其他环境因素的交互作用, 计算交互作用超额相对危险度(relative excess risk of interaction, *RERI*), 交互作用指数(the synergy index *S*, *S*), 归因交互效应百分比(attributable proportion of interaction, *AP*%), 检验标准均为 $\alpha = 0.05$。

2 结 果

2.1 HPV DNA PCR 检测结果(表 2) HPV 通用序列 L1 在肺癌组织中的检出率为 31.67% (19/60), 与对照组 20.00% (12/60) 比较差异无统计学意义, HPV 特异序列 E6、E7 的检出率分别为 20.00% (12/60) 和 15.00 (9/60)。HPV E6 序列检出即 HPV 16 感染的非吸烟女性患肺癌的危险度是未感染者的 3.50 倍, $P < 0.05$。

表 2 HPV 感染与非吸烟女性肺癌发生关系

HPV 序列		病例组	对照组	*P* 值	*OR*	95% *CI*
HPV L1	+	19	12	0.144	1.854	0.805~ 4.269
	−	41	48			
HPV E6	+	12	4	0.032	3.500	1.059~ 11.568
	−	48	56			
HPV E7	+	9	4	0.142	2.471	0.717~ 8.515
	−	51	56			

2.2 FHIT 基因 LOH 分析(表 3) 对 3 个位点进行 LOH 分析, 60 例肺癌组织中有 35 例(58.33%) 存在一个或多个位点的 LOH。D3S1234, D3S1300, D3S1313 3 个位点的 LOH 发生率分别为 26.67%, 21.67%, 23.33%。在 HPV DNA 检出的组织中该基因的杂合子丢失率更高(78.94%), 与 HPV 感染阴性的组织(48.78%) 相比差异有统计学意义, *OR* = 3.938, 95% *CI* = 1.115~ 13.903, 提示 HPV DNA 的插入使 FHIT 基因多个位点杂合子丢失频率增加($P < 0.05$)。

2.3 非吸烟女性肺癌因素分析(表 4) 单因素条件 Logistic 回归分析表明, 被动吸烟、饮酒、烹调油烟暴露、肺癌家族史、既往肺部疾病史、月经经期不规则、使用口服避孕药及多次流产均对非吸烟女性肺癌的发生产生影响($P < 0.05$)。进一步多因素 Logistic 回归分析发现, 既往肺部疾病史、烹调油烟暴露及口服避孕药是非吸烟女性肺癌的主要危险因素, 其 *OR* 值分别为 4.607, 3.695, 4.009。

2.4 非吸烟女性各危险因素间交互作用 用叉生法分析表明, HPV 感染与口服避孕药、既往肺部疾病史之间存在交互作用, 其中与口服避孕药使用的交互作用较强, 归因交互效应百分比可达 56.2% ($P < 0.05$), 但 FHIT 基因杂合性丢失与以上危险因素之间未见有意义的交互作用。

表 3 HPV 感染对女性肺癌 FHIT 基因 LOH 危险度估计

位 点		HPV+	HPV−	*P* 值	*OR*	95% *CI*
D3S1313	+	5	11	0.967	0.974	0.284~ 3.342
	−	14	30			
D3S1300	+	7	6	0.052	3.403	0.953~ 12.145
	−	12	35			
D3S1234	+	8	6	0.019	4.242	1.207~ 14.908
	−	11	35			
至少一个位点	+	15	20	0.027	3.938	1.115~ 13.903
有 LOH	−	4	21			

表 4 女性肺癌危险因素 Logistic 回归分析

因 素	病例	对照	β	S_E	*P* 值	*OR*	95% *CI*
被动吸烟	29	18	0.813	0.670	0.225	2.254	0.606~ 8.383
烹调油烟暴露	36	20	1.307	0.607	0.031	3.695	1.123~ 12.151
月经周期不规则	18	7	0.654	0.773	0.398	1.923	0.423~ 8.750
使用口服避孕药	24	7	1.389	0.690	0.044	4.009	1.036~ 15.507
流产(≥2 次)	25	15	0.536	0.704	0.447	1.709	0.430~ 6.790
肺癌家族史	14	5	0.163	0.714	0.820	1.177	0.290~ 4.771
肺部疾病史	25	9	1.528	0.737	0.038	4.607	1.088~ 19.516
饮酒	13	5	−0.452	0.861	0.600	0.637	0.118~ 3.442

3 讨 论

HPV 感染与非吸烟女性肺癌发生关系是目前研究的热点问题。Cheng[5]等研究肺癌与 HPV 感染关系时发现, 女性肺癌患者 HPV 感染率明显高于男性。本研究采用通用引物 L1 及高危型 HPV 16/18 特异引物 E6、E7 3 对引物检测的型特异性试验, 检测发现肺癌组织 HPV E6 检出率高于正常对照, 与上述研究结果相近。目前多认为 HPV 早期蛋白编码区的 E6、E7 与其致癌性有关, 本研究 E6 DNA 序列的高检出率提示, HPV16 感染与女性肺癌发生有关, 推测 HPV DNA 可能以插入的方式整合入宿主染色体导致抑癌基因失活。抑癌基因 FHIT 易于断裂且覆盖 HPV16 整合位点, 野生型 FHIT 基因可能由于病毒 DNA 整合发生 LOH。李立等[6]研究显示, 该基因的 3 个位点的 LOH 频率均> 60%, 本研究结果与其相似, 且 HPV 感染者发生 LOH 频率较高。台湾一项研究证明, HPV 16DNA 插入 FRA3B 位点是 HPV 相关肺癌发生的可能机制之一[7], 本研究也验证了该结果。

进一步分析危险因素发现, 烹调油烟暴露、既往肺部疾病史及使用口服避孕药均对非吸烟女性肺癌发生有一定的作用, 与以往研究结果一致[8]。叉生法分析各危险因素的交互作用, 发现 HPV 感染与口服避孕药、既往肺部疾病史之间有交互作用, 提示 HPV 感染扩大了外源性雌激素对女性肺癌发生的影响, 有既往肺部疾病史的女性, HPV 感染对其肺癌发生的影响更加明显。

参考文献

〔1〕 Fei Y, Yang J, Hsieh WC, et al. Different human papillomavirus 16/18 infection in Chinese non-small cell lung cancer patients living in

中国公共卫生 CPH

Wuhan, China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2006, 36(5): 274- 279.
〔2〕 Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, et al. Human papilloma virus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(5): 1157- 1164.
〔3〕 Wilke CM, Hall BK, Hoge A, et al. FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV 16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites [J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(2): 187- 195.
〔4〕 Butler D, Collins C, Mabruk M, et al. Deletion of the FHIT gene in neoplastic and invasive cervical lesions is related to high-risk HPV infection but is independent of histopathological features[J]. J Pathol, 2000, 192(4): 502- 510.
〔5〕 Cheng YW, Chiou HL, Chen JT, et al. Gender difference in human papilloma virus infection for non-small cell lung cancer in Taiwan [J]. Lung Cancer, 2004, 46(2): 165- 170.
〔6〕 李立, 安倩, 程书钧, 等. 肺癌组织 3 号染色体短臂上抑癌基因异常改变的初步分析[J]. 中华医学杂志, 2001, 81: 399- 401.
〔7〕 Cheng YW, Chiou HL, Sheu GT, et al. The Association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women[J]. Cancer Res, 2001, 61(7): 2799- 2803.
〔8〕 张扬, 陈坤, 张海蕾, 等. 非吸烟女性肺癌发病危险因素的 Meta 分析[J]. 中国公共卫生, 2001, 18(10): 869- 870.

收稿日期: 2007-10-08　(郭长胜编辑　孔繁学校对)

文章编号: 1001-0580(2008)05-0515-02　中图分类号: R 163　文献标志码: A

【调查研究与分析】

河南省成年居民饮酒状况及影响因素分析*

杨永利, 时松和, 施学忠

摘　要: 目的　了解河南省 18 岁以上居民饮酒状况及其影响因素, 为制订卫生服务策略提供依据。方法　采用多阶段分层抽样方法, 使用世界卫生组织《健康和卫生系统反应性》量表, 对 3 000 名河南省居民进行问卷调查。结果　河南省 18 岁以上男性、女性居民及总饮酒率分别为 81.2%, 33.1%, 58.2%; Logistic 回归分析显示, 不同年龄、性别、经济收入、文化程度的人群饮酒率不同($P < 0.05$); 经常饮酒的人群已意识到饮酒有害健康, 但 81.4% 的人仍坚持饮酒。结论　加强对男性、< 40 岁、文化程度较高、经济收入高人群饮酒行为的干预和教育, 是降低河南省居民饮酒率的关键。

关键词: 饮酒; 影响因素; Logistic 回归分析

Investigation on drinking prevalence and influencing factors in adults of Henan province.

YANG Yong-li, SHI Song-he, SHI Xue-zhong. Department of Health Statistics, College of Public Health, Zhengzhou University (Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Objective　To know drinking prevalence and it's influencing factors among residents over 18 years old in Henan province. **Methods**　Using the method of multistage stratified sampling, 3 000 subjects were investigated with the questionnaire of "health and health system responsiveness" designed by WHO. **Results**　The drinking prevalence was 81.2% in male, 33.1% in female and 58.2% in total. Logistic regression analysis showed the drinking frequency was different in residents with different age, gender, economic income, and education level. 81.4% of drinker still went on drinking although they had realized alcohol was harmful to their health. **Conclusion**　It is the key point of lowering the drinking prevalence to enhance behavioral intervention and health education in the population of middle- old age, male, higher education level, higher income.

Key words: drinking; influence factor; logistic, regression analysis

从 20 世纪 80 年代以来, 我国的酒精消费量一直呈上升趋势。1998 年和 2001 年全国饮酒状况调查表明, 我国居民的饮酒率分别为 59.5%[1] 和 59.0%[2], 2006 年我国的酒精销售量比 2005 年增长了 23.46%。酒精已对人们的身心健康构成很大的威胁[3,4], 尽管各地政府部门也采取了一定的干预措施限制酒精的消费, 但人们的饮酒行为并没有明显的改善。为了解河南省居民饮酒状况, 不同特征人群的饮酒分布以及限酒、戒酒措施, 为政府部门制订预防措施, 有效地进行社区防治提供科学依据, 进行了本研究。

1　对象与方法

1.1　对象　采取多阶段分层抽样方法, 利用 2000 年人口普查资料, 随机抽取河南省 12 个城市、40 个县城(乡镇)、151 个村(居委会), 在每个调查家庭中随机选择 1 名年龄在 18 岁或 18 岁以上的成员作为调查对象。设计抽样人口为城市 1 000 人, 县及乡村 2 000 人, 实际调查 3 000 人, 其中城市为 1 059 人, 县及乡村为 1 941 人。

1.2　方法　采用问卷形式进行调查。调查员由经过统一培训的高年级医学本科生担任, 每份调查问卷时间不少于 30 min。调查表采用世界卫生组织(WHO)设计的《健康和卫生系统反应性》量表。包括人口及一般状况调查、健康状态描述、健康状态评价、嗜好、卫生系统反应性等内容。主要分析被调查者在过去 1 年内饮酒、饮酒频率情况、每次饮酒量以及饮酒对身体健康的影响及采取的控酒措施等。饮酒量的标准采用 WHO 的定义, 即 1 个标准饮酒量相当于 285 ml 的啤酒、30 ml 的烈酒、120 ml 的葡萄酒或 60 ml 的开胃酒。

1.3　统计分析　用 Microsoft Access 建立数据库, 采用 SPSS 13.0 软件进行 χ^2 检验、秩和检验、Logistic 回归分析等; 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

* 基金项目: WHO 资助课题
作者单位: 郑州大学公共卫生学院卫生统计学教研室, 郑州 450001
作者简介: 杨永利(1974-), 女, 河南温县人, 讲师, 博士, 主要从事居民健康评价和慢性病流行病学研究。
通讯作者: 施学忠